

# Charakterystyka systemu flagelinowego bakterii gram-ujemnych

Edyta Żyła

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

zyla.edyta@doctoraj.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką dr hab. Joanny Berety

**Flagela jest głównym elementem mechanizmu ruchu bakterii w środowisku. Umożliwia przemieszczanie się bakterii w odpowiedzi na gradient zarówno atraktantów jak i repelentów. Pod wpływem bodźców ze środowiska bakteria dokonuje zmiany kierunku rotacji flageli, dzięki czemu może zmienić kierunek ruchu. Dzięki temu bakterie są w stanie nie tylko przeżyć, ale i rozprzestrzeniać się w nowym środowisku. Flagela wydaje się być również istotna dla procesu zakażenia komórek gospodarza oraz dla przetrwania w organizmie gospodarza, ponieważ ułatwia proces adhezji do komórek eukariotycznych oraz tworzenie biofilmu w zakażonych tkankach. Dzięki swojej budowie, pełni także funkcję wyjątkowego systemu sekrecyjnego, odpowiadającego za transport własnych zewnątrzkomórkowych białek budujących flagelę i białek regulujących wydłużanie filamentu flageli. Składanie systemu następuje etapowo i jest ściśle regulowane. Geny systemu flagelinowego są posegregowane w klasy, które ulegają ekspresji w ściśle określonych warunkach, przy czym jedna klasa może negatywnie lub pozytywnie regulować ekspresję kolejnej. Niniejsza praca przedstawia budowę systemu flagelinowego, proces jego składania i sposób, w jaki dokonuje się zmiana kierunku rotacji flageli. Dodatkowo, opisuje proces sekrecji białek przez system flagelinowy oraz sposób, w jaki może on być wykorzystany w immunoterapii nowotworów.**

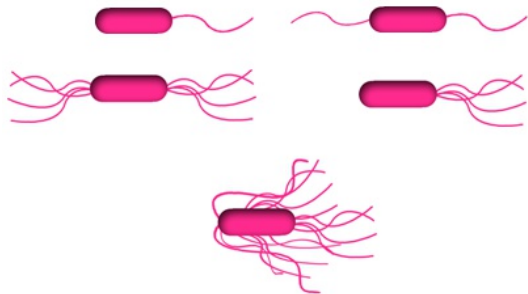
## Wstęp

System flagelinowy jest jednym z mechanizmów ruchu wykorzystywanych przez szerokie spektrum bakterii zarówno gram-dodatnich, jak i gram-ujemnych [1,2]. W zależności od rodzaju, bakterie posiadają od jednej do kilku flageli, które są rozmieszczone w różny sposób. Istnieją cztery klasy dystrybucji flageli na powierzchni komórki bakteryjnej (ryc. 1.).

Mechanizm ruchu polega na szybkim obracaniu się filamentu flagelinowego wokół własnej osi dzięki wprawianiu go w ruch przez transbłonowy motor [3]. Sam motor flageli może kręcić się z prędkością nawet do 100 000 obrotów na minutę (rpm) [4], jednak po dołączeniu do niego długiego filamentu flagelinowego prędkość spada do 100 rpm. Co ciekawe, filament

może obracać się zgodnie (*clockwise*, CW) lub przeciwnie (*counterclockwise*, CCW) do ruchu wskazówek zegara, wymuszając zmianę kierunku przemieszczania się bakterii (ryc. 2). Bakteria, kontrolując kierunek obrotu motoru, może szybko odpowiadać na zmiany środowiska, co pozwala na jej przeżycie i kolonizację nowych obszarów [5,6].

System flagelinowy jest spokrewniony z systemem sekrecyjnym typu trzeciego (*type 3 secretion system*, T3SS) odpowiadającego za wydzielanie białek decydujących o inwazyjności bakterii chorobotwórczych w organizmie gospodarza [7,8]. Podobieństwo można odnaleźć nie tylko w planie budowy systemów, ale również w strukturze budujących ich białek [8,9]. Niestety, do tej pory nie rozstrzygnięto sporu, który z nich jest ewolucyjnie starszy [10].

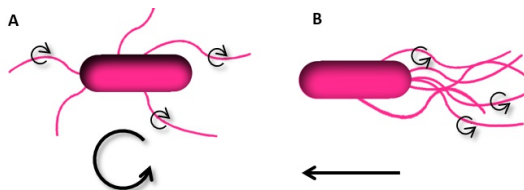


**Ryc. 1.** Dystybucja wici na powierzchni bakterii

W naszej pracy skupiamy się na omówieniu najważniejszych aspektów dotyczących systemu flagelinowego u bakterii gram-ujemnych, ponieważ większość prac nad strukturą flageli była prowadzona na bakteriach *E. coli* i w nich została lepiej poznana.

Poza wiciami (flagelami) na swojej

powierzchni bakteria posiada fimbrie ruchowe, które również pełnią funkcje motoryczne. W porównaniu do flageli są znacznie krótsze i jest ich znacznie więcej. Ich funkcją jest regulowanie przepływu płynów wokół bakterii oraz wspomaganie adhezji [11].



**Ryc. 2.** Sposób poruszania się bakterii w zależności od kierunku rotacji rotora flageli. Obrót rotora w kierunku CW powoduje, że bakteria obraca się wokół własnej osi (A). Kiedy sposób rotacji rotora zmienia się na CCW, bakteria porusza się naprzód (B).

## Budowa systemu flagelinowego

System flagelinowy złożony jest z 30 różnych białek, w tym niektórych występujących w kilku lub wielu kopiach [4,12,13,14], zaś proces składania maszynierii ruchu wymaga transkrypcji ponad 50 różnych genów [15]. Geny systemu flagelinowego są zorganizowane w operony znajdujące się pod kontrolą promotorów należących do trzech różnych klas, których aktywacja musi być ściśle kontrolowana (ze względu na ten podział możemy mówić o promotorach i operonach a także genach klasy pierwszej, drugiej i trzeciej lub odpowiednio fazy wczesnej, pośredniej i późnej) [16]. W budowie systemu flagelinowego wyróżnia się trzy główne elementy: ciało podstawowe, hak oraz filament flagelinowy (ryc. 3).

a) Wewnątrzkomórkowe ciało podstawowe składa się z dwóch typów podjednostek - nieruchomych statorów oraz ruchomego rotora, które są połączone ze sobą oddziaływaniami elektrostatycznymi [17] i razem tworzą tzw. motor systemu. Co więcej, oddziaływanie naładowanych reszt białek rotora i statora może mieć znaczenie dla wytworzenia ruchu obrotowego [18]. Rotor jest rozbudowaną strukturą składającą się z kanału i pierścieni ulokowanych w błonach komórkowych i ścianie komórki. Pierwszy pierścień - MS, (*Membrane/supramembrane ring*) zlokalizowany w błonie komórkowej pozostaje w kontakcie ze statorem oraz z cytoplazmatycznym pierścieniem C (omówionym poniżej). W części dystalnej rotora występują: znajdujący się w obrębie warstwy peptydoglikanowej pierścień P oraz pierścień L umiejscowiony w zewnętrznej błonie bakterii gram-ujemnych w bliskim sąsiedztwie lipopolisacharydu. Bakterie gram-dodatnie nie posiadają pierścienia L i P. Każdy z pierścieni ma za zadanie utworzyć por łączący cytozol bakterii ze środowiskiem zewnętrznym. Dzięki temu białka tworzące zewnątrzkomórkowe elementy systemu flagelinowego, mogą być bezpośrednio transportowane z cytozolu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Cytoplazmatyczny pierścień C, który nie wchodzi w skład rotora *per se*, jest zbudowany z 32-36 kompleksów białek FliG, FliM i FliN, a jego główną funkcją jest zmiana kierunku obrotów rotora [19]. Białka FliG oraz FliM są białkami efektorowymi. Przez długi czas sądzono, że FliN

stanowi rusztowanie dla pozostałych białek pierścienia C, jednak okazuje się, że bierze aktywny udział w zmianie kierunku obrotu rotora na CW [21,22,23,24]. Białka należące do pierścienia C są określane jako kompleks przełącznikowy (ang. *switch-complex*), który odpowiada za wprowadzenie rotora w ruch, zmianę kierunku rotacji, a także formowanie całego filamentu [25,26,27,29,30]. Pierścień C jest stabilizowany przy błonie komórkowej dzięki oddziaływaniu białka FliG z białkiem MotA statora oraz białkiem FliF pierścienia MS [31,32]

W ciałku podstawowym występuje 10-12 statorów ułożonych wokół rotora. Każdy ze statorów zbudowany jest z czterech podjednostek MotA oraz dwóch MotB [33]. Białka MotA posiadają cztery transbłonowe domeny, zaś MotB tylko jedną, ale w kompleksie MotA<sub>4</sub>MotB<sub>2</sub> suma domen wynosi aż 18. Statory tworzą kanały jonowe w błonie komórkowej; ich charakterystyczna budowa sugeruje, że jeden stator tworzy dwa kanały jonowe [34]. Statory są zakotwiczone w błonie komórkowej przez białka MotB [35], które niekowalencyjnie oddziałują z warstwą peptydoglikanu [4], co jest istotne dla ruchu obrotowego rotora [36]. W skład ciałka podstawowego wchodzi również ATPaza, należąca do rodziny sekrecyjnych ATPaz. Poza transportem protonów przez błonę komórkową, jest jednym ze źródeł energii niezbędnej do eksportu białek flageliny i niektórych białek regulujących utworzenie kompletnego systemu flagelinowego [37]. ATPaza flagelinowa składa się z białek FliH, FliI oraz FliJ

[38, 39]. FliI, dzięki aktywności ATPazowej znajdującej się na C-końcu białka [40], promuje przejście białek sekrecyjnych do kanału rotora przez tzw. bramę utworzoną z białek FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ i FliR. Najnowsze badania pokazują, że obecności białek FliH, FliI i FliJ zwiększa wydajność eksportu przez system flagelinowy, jednak nie jest niezbędna dla tego procesu [41], dlatego rola ATPazy flagelinowej nie jest dokońca poznana [41, 42].

Warto dodać, że białka fazy późnej (tj. kodowane przez operony klasy trzeciej) wymagają przy transporcie asysty białek opiekuńczych: FlgN jest wymagane dla FlgK i FlgL, FliS dla FliC oraz FliT dla FliD [43, 44]. Te specyficzne substratowo białka opiekuńcze zapobiegają degradacji i agregacji transportowanych białek [45, 46, 47].

b) Zakotwiczony w błonie komórkowej hak. Jest elementem łączącym rotor z filamentem flagelinowym [27, 30] i jest zbudowany z ponad 100 kopii białka FlgE. Początkowo na jego końcu znajduje się czapeczka utworzona z białek FlgD, która po dojrzaniu haka jest zastępowana elementem łącznikowym zbudowanym z FlgK i FlgL [48]. Długość haka wynosi  $55 \pm 6$  nm i jest ściśle kontrolowana przez białka FliK i FlhB. Ze strukturą haka związane są białka HAP (*Hook Associated Proteins*), do których należą m.in.: FlgK i FlgL, które uczestniczą w jego łączeniu z filamentem flagelinowym [49]. Struktura haka wraz z ciałkiem podstawowym nazywana

jest w skrócie HBB (ang. *hook-basal body structure*).

c) Filament flagelinowy stanowi największą część systemu flagelinowego. Jest on długą, helikalną strukturą zbudowaną z tysięcy monomerów białka flageliny ułożonych w 11 proto-filamentów [50, 51]. Helisa flageli występuje w konformacji R (right-handed) i L (left-handed), które zmieniają się w zależności od kierunku rotacji rotora [52].

Flagela zbudowana jest ok. 20 000 monomerów flageliny FliC lub FljB [40], a jej długość może osiągać nawet 15-20  $\mu\text{m}$ . Rodzaj białka flageliny, który buduje flagelę, jest determinowany przez pewne warunki zewnętrzne, a aktywacja transkrypcji genu *fliC* lub *fliB* jest regulowana w procesie zwanym *Flagellar Phase Variation* (opisanym poniżej).

Filament jest okryty czapeczką zbudowaną z monomerów białka FliD, która jest niezbędna do odpowiedniego pozycjonowania i dołączania kolejnych monomerów flageliny budujących filament oraz bierze udział w kontroli jego długości [13]. Struktura flageli jest wrażliwa na różnego rodzaju czynniki środowiskowe takie jak: pH, siła jonowa, czy siły powodujące uszkodzenia mechaniczne. Również mutacje mogą powodować przyjmowanie nieprawidłowej formy helisy filamentu i zaburzać ruch [53, 54].

### **Flagellar Phase Variation - koło zapasowe bakterii**

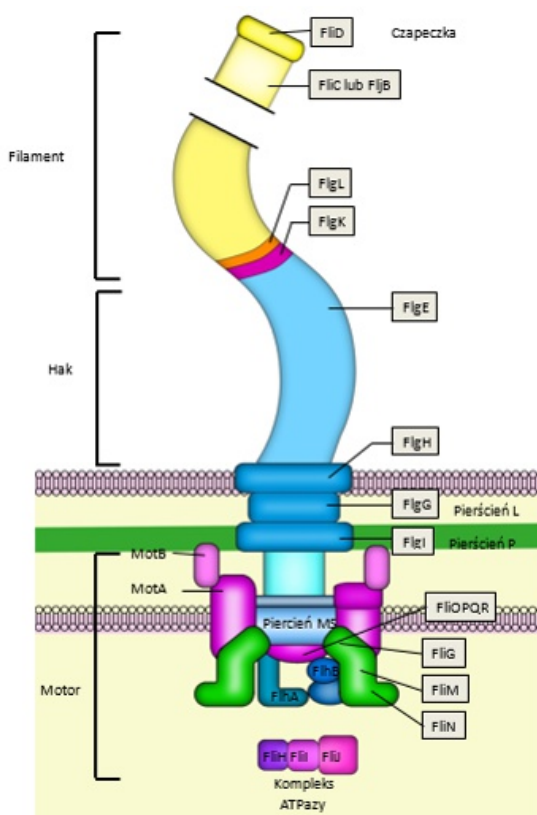
Niektóre bakterie rodzaju *Salmonella*



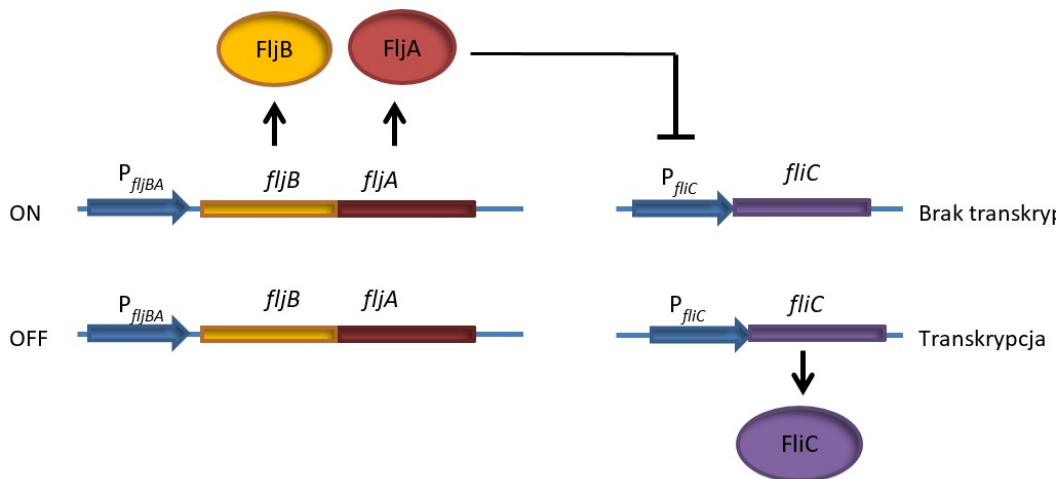
mają unikalną zdolność do zmiany rodzaju białka tworzącego filament flagelinowy. Cecha ta jest zależna od gatunku, a nawet serotypu bakterii. Długi filament flagelinowy jest w zależności od warunków tworzony z flageliny FliC lub FljB. Loci obu genów znajdują się w odrębnych miejscach chromosomu bakteryjnego i w danym czasie dochodzi do ekspresji tylko jednego z nich. Flagelina fazy drugiej, kodowana przez gen *fljB*, jest używana rzadziej niż flagelina fazy pierwszej kodowana przez *fliC*, dlatego prawdopodobnie jest mniej istotna dla przetrwania bakterii. Przypuszczalnie flagelina fazy drugiej jest „kołem zapasowym” bakterii, której synteza następuje w nagłych przypadkach, kiedy natychmiast musi dojść do syntezy flageli, a z pewnych przyczyn nie jest możliwa ekspresja FliC. To może również wyjaśniać dlaczego loci genów są rozdzielone [55].

Wraz z ekspresją genu *fljB* następuje ekspresja *fljA*, który pełni funkcję transkrypcyjnego represora genu *fliC* co zapobiega biosyntezie obu typów flageliny jednocześnie (ryc. 4.). Bonifield sugeruje, że FljA oddziałując z 5'UTR transkryptu *fliC* po pierwsze hamuje transkrypcję przez atenuację, a po drugie zasłania miejsce wiązania rybosomu, co hamuje translację. Promotor operonu *fljBA* może występować w dwóch konformacjach: „ON” w której następuje ekspresja genów i „OFF”, w której jest ona zahamowana. Kiedy promotor występuje w konformacji „ON”, następuje transkrypcja genów *fljB*, której produkt będzie budować filament flagelinowy i *fliA*,

którego produkt będzie hamować ekspresję *fliC* na poziomie transkrypcji jak i translacji [56]. Niestety, od 1922 roku (kiedy po raz pierwszy zostało opisane zjawisko *Flagellar Phase Variation*) nie udało się ustalić dlaczego dochodzi do zmiany rodzaju białka budującego filament flagelinowy. Niektóre badania sugerują, że może mieć to związek z procesem patogeny [57 za Andrewes 1922].



**Ryc. 3.** Komponenty flageli *S. Typhimurium*. Rysunek przedstawia strukturę systemu flagelinowego zakotwiczonego w błonie i ścianie komórkowej oraz w błonie zewnętrznej. Główne elementy systemu to ciało podstawowe, hak oraz filament. Kompleks ATPazy utworzony z białek FliH FliI FliJ jest jedynym rozpuszczalnym elementem systemu flagelinowego. Na podstawie: Chevance & Hughes Nature 2008



**Ryc. 4.** Schemat regulacji ekspresji genów flageliny. Białko flageliny powstaje w wyniku ekspresji genu *fliC* lub *fljB*. Wraz z ekspresją genu kodującego flagelinę FljB następuje ekspresja białka FliA. FliA hamuje biosyntezę flageliny FliC, co zapobiega produkcji dwóch typów flageliny w jednym czasie.

### System flagelinowy jako system sekrecji

Jak wspomniano wcześniej, system flagelinowy pełni funkcję systemu sekrecyjnego, który ogranicza się do eksportu białek budujących hak oraz flageliny. Wydzielane cząsteczki flageliny oddziałują kolejno ze sobą tworząc solenoidową strukturę otaczającą kanał. Na przekroju kanału znajduje się 11 monomerów flageliny, stąd w strukturze dojrzałej flageli wyróżnia się 11 protofilamentów [58, 59, 60]. Po ukończeniu syntezy flageli przez kanał transportowane są nadal cząsteczki flageliny potrzebne do uzupełniania zniszczonych fragmentów filamentu, a także niektóre białka regulatorowe. Według obecnej wiedzy, żadne inne białka, które nie są związane z systemem flagelinowym, nie są transportowane przez ten system sekrecji. Ponieważ średnica kanału jest bardzo mała (ok. 20 Å) [61], to transportow-

ane cząsteczki białek muszą pokonywać go w postaci niesfałdowanej; prawdopodobnie proces zachodzi ko-translacyjnie [41]. Nie określono konsensusowej sekwencji sekrecyjnej dla białek wydzielniczych systemu flagelinowego [62,63,64] jednak pomimo różnic w sekwencji wiadomo, że charakteryzuje się brakiem struktury i w większości przypadków znajduje się na N-końcu białka [64,65]. Ponadto podejrzewa się, że sygnałem do rozpoczęcia sekrecji jest fragment 5'-UTR mRNA, na którym trwa translacja, a który jest rozpoznawany przez właściwe białka opiekuńcze [60,66]. Prawdopodobnie brak rozdziału transkrypcji i translacji w czasie umożliwił wytworzenie sygnału do wydzielenia jeszcze niepowstałego białka [67], a kierowanie białka do kanału sekrecyjnego zachodzi ko-translacyjnie [12]. W przypadku genu *fliC*, sygnał odczytywany z końca 5'-UTR mRNA jest znaczący do wydajne-

go wydzielania białka flageliny na zewnątrz. Badania opierające się na mutagenizie genu *fliC* ujawniły, że nawet pojedyncze zmiany w sekwencji 5'-UTR mRNA *fliC*, mogą zaburzyć proces sekrecji białka FliC [63].

## Generowanie ruchu

Rotacja flageli jest zależna od kierunku obrotów rotora znajdującego się w ciałku podstawowym. Jak wspomniano wcześniej może się on poruszać zgodnie lub przeciwnie do ruchu wskazówek zegara. Rotacja CCW pozwala na płynny i ruch bakterii naprzód, podczas gdy rotacja CW powoduje obracanie się jej w okół własnej osi. Odpowiedź na chemoatraktanty i chemorepelenty powoduje zmianę długości fazy ruchu i fazy obrotu, który wyznacza nowy kierunek przemieszczania się. Obrany kierunek jest przypadkowy jednak bakteria zmieni swoje położenie względem atraktanta czy repelenta. Spowoduje to, że kolejne bodźce działające na receptory będą silniejsze lub słabsze [68]. Z tego względu, ukierunkowany ruch w gradiencie substancji, wymaga aby odpowiedź miała zdolność do adaptacji otrzymywanego sygnału. Proces transdukcji sygnału w odpowiedzi na bodziec, który prowadzi do zmiany kierunku ruchu rotora zachodzi bardzo szybko (mniej niż 200 ms) [69, 70]. Jest to bardzo ważne z punktu widzenia przetrwania bakterii, ponieważ umożliwia szybką reakcję i adaptację chemotaksji w odpowiedzi na bodźce.

## Czynniki wpływające na ruch

Ruchliwość i chemotaksja są niezbędne do przetrwania bakterii i adaptacji do nowych warunków środowiska. Bakteria odpowiada na bodźce zewnętrzne przez zmianę kierunku przemieszczenia się, a także zmianę profilu ekspresji genów systemu flagelinowego. Obniżone stężenie tlenu, lekko kwaśne pH [71], wzrost gęstości zawiesiny bakteryjnej, wzrost poziomu cAMP [72,73], wysoki poziom hydratacji środowiska [74] i wiele innych czynników powoduje indukcję ekspresji genów flageli u różnych gatunków bakterii. Natomiast obecność D-glukozy, wysoka temperatura i wysokie stężenie soli, a także skrajne pH powodują zahamowanie ekspresji genów flageli [75,76,77,78]. Należy pamiętać, że różne warunki mogą zmieniać poziom ekspresji genów systemu flagelinowego w różny sposób, w zależności od gatunku bakterii.

## Przekaz sygnału w odpowiedzi na bodźce

Głównym elementem sensorycznym systemu ruchu są białka MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*), należące do transbłonowych dimerycznych receptorów występujących w wewnętrznej błonie komórkowej [79, 80]. Bakteria może rozpoznać, czy dana substancja należy do repelentów (np. zagrażających jej życiu toksyn) czy atraktantów (np. składników odżywczych), które w odmienny sposób będą wpływać na MCP. U bakterii *E. coli* wyróżnia się cztery główne rodzaje receptorów MCP: dla seryny

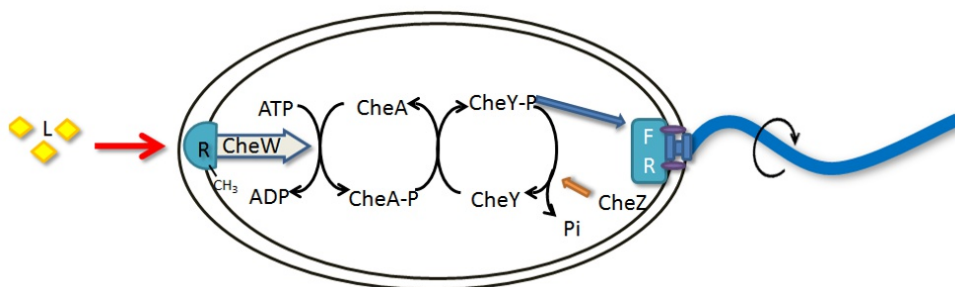
(Tsr), maltozy i asparagianinu (Tar, które podobnie jak Tsr są wrażliwe również na niektóre repelenty), rybozy i galaktozy (Tgr) oraz dipeptydów (Tap) [81]. W przypadku bakterii *Salmonella* odnaleziono dodatkowe chemoreceptory McpA, McpB i McpC, które nie zostały rozpoznane w żadnym innym organizmie [16, 82]. Wiadomo, że McpB i McpC są aktywowane w odpowiedzi na L-cytseinę i L-cystynę, jednak nadal nie odnaleziono liganda dla McpA [81]. McpA i McpB występują w postaci dimerów, ale dowiedziono, że mogą tworzyć trimery, co nie jest wyjątkowe wśród białek MCP [16,82].

Związanie repelenta lub (uwolnienie atraktanta) przez MCP powoduje autofosforylację kinazy CheA, która następnie fosforyluje CheY (rys. 5). Ufosforylowany CheY dyfunduje do motoru flageli i oddziałując z jego białkami zmienia kierunek rotacji na CW. Bakteria przestaje podążać naprzód i zaczyna kręcić się w kółko. Z kolei szybka defosforylacja CheY przez fosfatazę CheZ powoduje włączenie ruchu CCW, pozwalającego

na przemieszczanie się bakterii na przód, ale już w zmienionym, innym kierunku [80] (ryc. 2.)

### Adaptacja do sygnału

System chemotaktyczny bakterii, który odpowiada na gradient substancji potrafi adaptować się do nowych warunków. Dzięki temu bakterie są w stanie odpowiadać na bardzo szeroki zakres stężeń chemoatraktanta, jednak wrażliwość na zmiany stężenia liganda jest wprost proporcjonalna do jego stężenia w otoczeniu bakterii [83]. Po rozpoczęciu transdukcji sygnału chemotaktycznego następuje regeneracja receptorów MCP. Adaptacja jest możliwa dzięki odwracalnej metylacji receptorów [80]. Poziom metylacji MCP jest uwarunkowany przez aktywność metyloesterazy CheB oraz (konstytutywnie aktywnej) metylotransferazy CheR. CheR preferencyjnie metyluje nieaktywne receptory, zaś CheB preferencyjnie demetyluje te, które są zaktywowane. Odwracalna metylacja białek MCP zachodzi na 4-6 resztach glutaminianu w części cytoplazmatycznej białka.



**Ryc. 5.** Transdukcja sygnału chemotaktycznego w bakteriiach *E. coli*. Po związaniu liganda (L) przez chemoreceptory (R) następuje przekaz sygnału przez kinazy Che. Ufosforylowany CheY wiąże FliM znajdujący się w rotorze flageli (FR) co wywołuje zmianę kierunku jego rotacji na CW.

Zmetylowany receptor MCP wzmacnia aktywność CheA, natomiast brak metylacji obniża aktywność CheA. Z kolei autofosforylacja CheA aktywuje metyloesterazę CheB, która usuwa grupy metylowe z MCP i przywraca zdolność do odpowiedzi na bodźce [80,84]. Zatem z jednej strony CheA stymuluje przekaz sygnału przez fosforylację CheY (co zachodzi bardzo szybko), a z drugiej wygasza przekaz sygnału przez stymulację demetylacji receptora MCP (co jest reakcją wolniejszą) [80].

### **Regulacja ekspresji genów klasy I, II i III odpowiedzialnych za składanie systemu flagelinowego**

Utworzenie funkcjonalnego systemu flagelinowego wymaga ekspresji przynajmniej 50 różnych białek [15]. Geny kodujące białka, które budują system flagelinowy, są zorganizowane w operony (wyróżnia się aż 17 operonów, których aktywacja jest niezbędna do powstania systemu flagelinowego). Znajdują się one pod kontrolą promotorów należących do pierwszej (wczesnej), drugiej (pośredniej) lub trzeciej (późnej) klasy [85,82,86] (ryc. 6.). Część z genów ulega ekspresji pod kontrolą promotorów należących zarówno do drugiej, jak i trzeciej klasy np. ekspresja *flgK*, *flgL*, *flgM*, *flgN*, *fliD* i *fliT*. Precyzyjna kontrola jest niezbędna do poprawnego utworzenia flageli [15,87,88]. Promotory pierwszej i drugiej klasy są aktywowane dzięki rekrutacji czynnika sigma70, zaś promotory trzeciej klasy wiążą polimerazę RNA za pośrednictwem

czynnika sigma28.

W odpowiedzi na sygnały ze środowiska dochodzi do aktywacji promotora pierwszej klasy, który kontroluje operon *flhDC* [73]. Białka FlhD oraz FlhC tworzą kompleks FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, który aktywuje zależny od czynnika sigma70 promotor klasy drugiej [16,89]. Aktywacja promotora klasy drugiej powoduje ekspresję genów kodujących białka potrzebne do złożenia funkcjonalnego ciała podstawowego i haka HBB. Do genów klasy drugiej należą m.in. geny białek FlgM i FliA.

### Aktywacja ekspresji genów pod kontrolą promotorów klasy drugiej

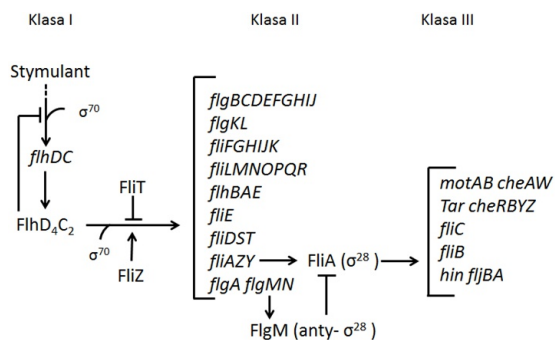
Białko FliA jest specyficznym dla systemu flagelinowego czynnikiem transkrypcyjnym sigma28, oddziałującym z promotorami trzeciej klasy [90]. Z kolei FlgM, tzw. „czynnik anty-sigma28”, ma za zadanie inaktywować działanie FliA. Oddziaływanie FlgM z FliA zapobiega transkrypcji genów znajdujących się pod kontrolą promotora klasy trzeciej, zanim nie zostaną ukończone wcześniejsze etapy produkcji białek i złożenie ciała podstawowego wraz z hakiem. Operony klasy trzeciej, które ulegają ekspresji dzięki aktywności czynnika FliA (sigma28) odpowiadają za produkcję białek fazy późnej składania systemu flagelinowego. Jednym z punktów kontrolnych jakie znajdują się na drodze do powstania funkcjonalnego systemu jest złożenie struktury HBB, bez której nie dojdzie do ekspresji operonów fazy późnej. Jak w takim razie komórka bakteryjna może w łatwy sposób roz-



poznać, że ok. 30 różnych białek uległo ekspresji i w poprawny sposób utworzyło strukturę HBB, szczególnie, że żadne z tych białek nie jest cząsteczką sygnałową *per se*? Okazuje się, że białko FlgM potrafi rozpoznać stopień zaawansowania powstającej flageli i jest głównym elementem punktu kontrolnego budowania kompleksu. W komórkach z funkcjonalnym HBB następuje wydzielanie czynnika FlgM (anty-sigma28) do medium i dzięki temu możliwa jest aktywacja transkrypcji genów flageli późnej fazy [91]. Dlatego białko FlgM uchodzi za kontrolera integralności całego systemu flagelinowego [15,91]. Wydzielanie FlgM z komórki zachodzi z minimalnymi kosztami energii dla komórki, ponieważ wydostaje się ono przez ten sam system sekrecji co białka flageliny budujące filament. Obniżenie stężenia FlgM w komórce aktywuje czynnik sigma28, który rozpoczyna transkrypcję genów znajdujących się pod kontrolą promotorów klasy trzeciej [12,92].

#### Punkt kontrolny składania flageli – białko FlgM

Chadsey i wsp. (1998) pokazali, że FlgM może wiązać FliA nawet gdy ten przyłączy się do kompleksu polimerazy RNA, dlatego po spełnieniu swojej roli FlgM musi być usuwany z bakterii, co pozwala uruchomić transkrypcję operonów klasy trzeciej [12,93]. Analiza wielowymiarowego NMR ujawniła, że białko FlgM w warunkach fizjologicznych jest w dużej mierze niesfałdowane [94]. FlgM oddziałuje



**Ryc. 6.** Regulacja transkrypcji operonów systemu flagelinowego. Master operon *flhDC* jest głównym elementem regulatorowym odpowiadającym za rozpoczęcie ekspresji genów systemu flagelinowego. Jego produkt *FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>* aktywuje ekspresję operonów klasy II, wśród których znajdują się geny kodujące białka *FliA* oraz *FlgM*, które regulują ekspresję operonów klasy III.

z *FliA* (sigma28) przez swoją C-kończącą domenę [87,88]. Związanie *FliA* powoduje, że część *FlgM* przybiera sfałdowaną konformację między 41-97 resztą aminokwasową, podczas gdy N-końcowy fragment białka, zawierający sygnał sekrecji, pozostaje nieustrukturyzowany [73]. Karlinsey i wsp. (2000) zauważyli, że, podobnie jak gen *fliA*, *flgM* ulega transkrypcji z dwóch promotorów: klasy drugiej i klasy trzeciej [12]. Badania pokazują, że *FlgM* jest transportowany przez flagelinowy system sekrecji w ten sam sposób jak białka flageliny, jednak wymaga do tego obecności *FlgN* [12,95,96]. Sekrecja białka *FlgM* jest zależna od zdolności jego wiązania z *FliA*, dlatego istnieją przypuszczenia, że to właśnie *FliA* może pełnić rolę chaperonu dla *FlgM* [94]. Z drugiej jednak strony,

produkcja stabilnego FlgM następuje przed syntezą FliA [96]. Xu i wsp. pokazali, że FliS moduluje aktywność FlgM, jednak nie jako białko opiekuńcze w klasycznym tego słowa znaczeniu. Potwierdzili hipotezę, że FliS zapobiega sekrecji i degradacji FlgM. Co ciekawe, w bakteriach *fliS*-zaobserwowano wzmożone wydzielanie FlgM, a towarzyszyła mu znacznie podwyższona aktywność promotorów klasy trzeciej [96]. Niektóre badania pokazują, że FliS może pełnić funkcję białka partnerskiego dla FlgM zanim dojdzie do produkcji FliA, mimo to, nie zostało ono uznane za białko chaperonowe dla FlgM [97]. FliS tworzy kompleks z FlgM, przysłaniając miejsce wiązania się FliA i działa jak kompetycyjny inhibitor do momentu powstania FliA [131]. FliS pełni funkcję białka opiekuńczego dla FliC, dlatego jest obecny podczas transportu flageliny do kanału systemu sekrecyjnego [96]. Nie poznano jeszcze mechanizmu uwalniania białka FliA przez FlgM, jednak zaraz po jego usunięciu rozpoczyna się transkrypcja genów znajdujących się pod kontrolą promotorów trzeciej klasy [96]. Pozwala to na produkcję białka flageliny typu FliC lub FljB, a także całego systemu chemosensorycznego [12].

#### Pętle sprzężeń zwrotnych regulujących aktywność promotorów

Białko FliZ jako pozytywny regulator promotorów klasy drugiej

Aktywacja promotorów klasy drugiej

przez kompleks FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> rozpoczyna ekspresję operonów *fliDST* i *fliAZ*. Powstały FliZ wzmacnia ekspresję operonów spod kontroli promotorów klasy drugiej przez dodatnie sprzężenie zwrotne [98]. Saini i wsp. (2010) pokazują, że FliZ może być aktywatorem FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> [98,99]. FliZ pełni rolę represora operonu *nlpC/ydiV*, którego produkt YdiV jest negatywnym regulatorem operonów klasy drugiej [86]. Białko YdiV wiąże kompleks FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> (przez interakcję z podjednostkami FlhD) i hamuje jego działanie [86,100].

#### Autoregulacja operonów klasy drugiej

Uznaje się, że białka FliA i FlgM specyficznie regulują operony należące do klasy trzeciej. Okazuje się, że nadekspresja czynnika sigma28 (FliA) prowadzi także do wzmożonej ekspresji genów będących pod kontrolą promotorów klasy drugiej [15].

Niektóre operony klasy drugiej np.: *fliAZY* podlegają transkrypcji zarówno przez kompleks sigma70-FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>-polimeraza RNA jak i sigma28 (FliA)-polimeraza RNA [101]. Jest to możliwe dzięki temu, że posiadają one sekwencje promotorów klasy II i III, które są zlokalizowane tandemowo i częściowo się zazębiają [101].

Co ciekawe czynniki FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> oraz sigma 28 (FliA) mogą ze sobą współpracować w celu ekspresji genów. Powstały dwa modele, które częściowo opisują mechanizm tego zjawiska. Pierwszy z nich sugeruje, że FliA, będący czynnikiem sigma28,

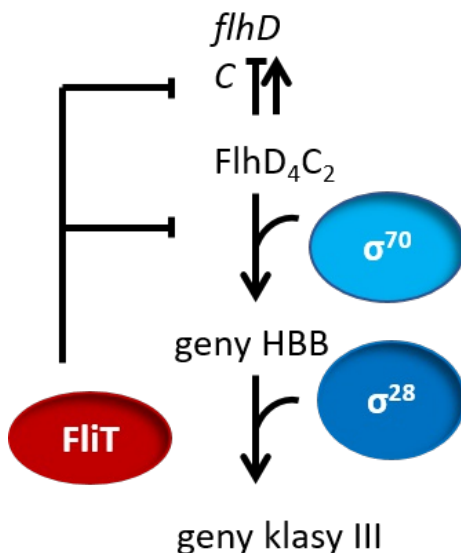
wiąże się do miejsca promotorowego drugiej klasy, zaś FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> jako pozytywny aktywator promuje stabilność kompleksu FliA i polimerazy RNA. Jeśli ta hipoteza okaże się prawdziwa, to znaczy, że transkrypcja operonów klasy drugiej może się rozpoczynać z dwóch niezależnych od siebie promotorów. Druga hipoteza zakłada, że FlgD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> jest czynnikiem sigma, zaś FliA pełni rolę białka asystującego w kompleksie FlgD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> z polimerazą RNA, a to wymusza sytuację w której każdy operon klasy drugiej może mieć tylko jeden promotor, który jest transkrybowany przez kompleks polimerazy RNA oddziałującej z FlgD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> i aktywowanej przez FliA [15].

#### Regulacja przez master-operon *flhDC*

Głównym operonem systemu flagelinowego jest operon *flhDC*. Brak operonu *flhDC* jako jedyny powoduje całkowite zahamowanie transkrypcji pozostałych genów systemu flagelinowego, ponieważ FlhD i FlhC są głównymi regulatorami operonów wszystkich pozostałych klas.

Jednym z białek, które wzmacnia aktywność FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> jest, jak wspomniano uprzednio FliZ. FliZ jest niezbędny do utrzymania poziomu białek FlhD i FlhC, a to w konsekwencji prowadzi do aktywacji ekspresji operonów pozostałych klas. W przypadku, gdy bakteria zostanie pozbawiona FliZ, następuje obniżenie ekspresji białek HBB, co prowadzi do zmniejszonej wydajności sekrecji białek, w tym białka FliD, które

umożliwia budowanie filamentu flageli (Patrz podrozdział Budowa systemu flagelinowego, filament flagelinowy). Ponadto, FliD wyłapuje wolne cząsteczki białka FliT, które jest inhibitorem FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> (Ryc. 7). FliT hamuje aktywację promotorów klasy drugiej, oddziałując z FlhC [102,103].



**Ryc. 7.** Schemat regulacji master operonu *flhDC*. Opis rysunku znajduje się w tekście.

#### **Salmonella VNP20009 i problemy z ruchem**

W Zakładzie Biochemii Komórki WBBIB UJ trwają prace nad poprawieniem właściwości przeciwnowotworowych bakterii *Salmonella Typhimurium* szczepu VNP20009. Docelowo bakterie mają zostać użyte w immunoterapii do wywołania odpowiedzi immunologicznej organizmu pacjenta, która będzie skierowana przeciwko komórkom

nowotworowym. Pionierem w wykorzystaniu bakterii w immunoterapii przeciwnowotworowej był dr William Coley [104]. W latach 20' ubiegłego wieku podawał swoim pacjentom tzw. toksynę Coleya, zawierającą martwe bakterie *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens*, które miały sprowokować układ odpornościowy do wytworzenia swoistej odpowiedzi immunologicznej również przeciwko komórkom nowotworowym. Podczas swojej pracy Coley podał toksynę prawie tysiącu pacjentów chorujących na nowotwory różnych typów. Ponieważ używał on różnych dawek, sposobów i częstości podawania toksyny, wyniki jego pracy były trudne do oceny pod względem powtarzalności. Jednak w wielu przypadkach kilkumiesięczne – lub kilkuletnie – leczenie doprowadziło do całkowitej regresji nowotworu, a czas przeżycia pacjentów leczonych toksyną znacznie się wydłużył, nawet w przypadku pacjentów z nieoperacyjnymi nowotworami [105]. Niestety jego praca badawcza spotkała się z dezaprobatą części środowiska medycznego ze względu na niejasność procesu i brak przewidywalności, co zatrzymało rozwój immunoterapii bakteryjnej aż do drugiej połowy lat 90.

Bakterie wykazują wiele zalet w porównaniu m.in. do biernie przenoszonych cząsteczek leków używanych w chemioterapii. Jako organizmy żywe, po poddaniu manipulacji genetycznej mogą produkować terapeutyczne białka: bezpośrednio wywołujące śmierć komórek nowotworowych albo stymulujące układ odpornościowy. Ponadto,

bakterie charakteryzuje nie tylko zdolność do poruszania się, ale również możliwość przemieszczania wraz z gradientem chemicznym różnych związków, czego nie robią wyżej wymienione cząsteczki chemoterapeutyków. Należy również dodać, że bakterie względnie beztlenowe wykazują chemotaksję względem różnego rodzaju atraktantów występujących w tkance nowotworowej jak np. obniżone stężenie tlenu oraz szereg związków odżywczych, uwalnianych do środowiska nowotworowego z nekrotycznych komórek [106]. Pozwala to bakterii penetrować wgłąb tkanki nowotworowej do miejsca najbardziej sprzyjającemu jej rozwojowi, a tym samym akumulacji bakterii, co może przyczynić się do lokalnego wzrostu stężenia terapeutyku przez nie produkowanego [107]. W przypadku terapii wykorzystującej bakterie, ważną kwestią jest również ich kontrolowane namnażanie, które można modulować przez antybiotykoterapię [108] po zakończonej terapii przeciwnowotworowej.

Bakterie *S. Typhimurium* należą do fakultatywnych beztlenowców, które namnażają się wewnątrzkomórkowo. Mogą gromadzić się w guzie ponieważ występuje tam stłumiona odpowiedź immunologiczna a dzięki tolerowaniu niskiego stężenia tlenu są w stanie przeżyć w tkance nowotworowej [128]. *Salmonella Typhimurium* VNP20009 jest jednym ze szczepów o potencjalnym zastosowaniu przeciwnowotworowym, ponieważ spełnia dodatkowe warunki, jakie pozwalają na jego wykorzystanie w terapii prze-

ciwnowotworowej. Przede wszystkim, poza wymienionymi powyżej cechami, szczep ten jest genetycznie zmodyfikowany tak, aby obniżyć jego patogenność, co pozwala na podanie bakterii do organizmu pacjenta bez obawy o wywołanie zbyt silnej reakcji immunologicznej skierowanej przeciwko bakteriom. Inwazyjność bakterii została osłabiona przez zakłócenie szlaku syntezy puryn oraz przez zaburzenie poprawnej syntezy lipidu A lipopolisacharydu [127]. Ingerencja w szlak syntezy puryn spowodowała, że bakterie VNP20009 chętniej lokalizują się w tkance nowotworowej, która jest bogata w substancje odżywcze. Warto nadmienić, że bakterie VNP20009 znalazły się w pierwszej fazie badań klinicznych, w której ustalono bezpieczną dawkę jaką można podać pacjentowi [128, 129]

Najnowsze badania dowodzą, że bakterie VNP20009 nie wykazują tak silnej chemotaksji w porównaniu do bakterii szczepu dzikiego [109]. Praca Brodway i wsp. pokazuje, że bakterie szczepu VNP20009 nie są zdolne do zmiany kierunku rotacji rotora, co tłumaczyło obniżoną ruchliwość [109, 110, 111]. Z badań wynika, że punktowa mutacja w, jak się okazuje, ważnej dla aktywności białka pozycji 110 proliny łańcucha polipeptydowego CheY, doprowadza do obniżenia jego aktywności [112]. Co ciekawe, przywrócenie funkcjonalnego białka CheY przez jego komplementację, doprowadza do poprawy ruchliwości bakterii, jednak nadal jest ona niższa niż w przypadku bakterii szczepu

dzikiego [109]. Prawdopodobnie bakterie nie mogą odzyskać pełnej zdolności do ruchu ze względu na jeszcze inne niezidentyfikowane mutacje mogące wpływać na system flagelinowy, co jest możliwe, jeśli wziąć pod uwagę dużą liczbę nagromadzonych mutacji w genomie (ok. 128 delecji w genomie i 48 polimorfizmów SNP) [113].

Wykorzystanie systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* w biotechnologii

Ze względu na swoje właściwości system flagelinowy może zostać zaadaptowany do potrzeb biotechnologicznych. Ponieważ jest on systemem sekrecyjnym, który wydziela tysiące cząsteczek białka flageliny, utworzenie białka rekombinowanego przez połączenie odpowiedniej sekwencji sekrecyjnej FliC z białkiem rekombinowanym, pozwala na wydzielanie dużej jego ilości do medium hodowlanego, co z kolei upraszcza proces oczyszczania [64, 114]. Dodatkową zaletą wykorzystania tego systemu jest fakt, że wydzielane białka zachowują swoją strukturę i funkcję [63]. W 2017 roku Zheng i wsp. wykorzystali bakterie *S. Typhimurium* produkujące białko flageliny pochodzące z *Vibrio vulnificus* do badań nad terapią przeciwnowotworową. Doświadczenia *in vivo* pokazały, że tak zmodyfikowane bakterie hamowały rozrost nowotworu a nawet powodowały całkowitą jego regresję [130].



## Wpływ flageli na adhezję i inwazyjność bakterii

System flagelinowy wpływa na wirulencję bakterii na wiele sposobów. Oprócz chemotaksji, flageli przypisuje się także rolę w adhezji do powierzchni komórek eukariotycznych, tworzenie biofilmu, a nawet regulację ekspresji typowych czynników wirulencji i ich sekrecji w celu rozpoczęcia inwazji komórek.

Adhezja jest jednym z pierwszych kroków do kolonizacji komórek gospodarza i nowego środowiska, przez co jest ściśle związana z patogenezą. Istnieją dwie hipotezy na temat bezpośredniego wpływu flageli na patogenezę i do dnia dzisiejszego zdania na temat tego czy flagela jest czynnikiem wirulencji są podzielone [115, 116, 117, 118]. Z naszych doświadczeń wynika, że bakterie pozbawione genu *fliC* są znacznie mniej inwazyjne w stosunku do komórek żernych niż bakterie posiadające gen *fliC* dlatego jesteśmy przychylni hipotezie, że flagela ma bezpośredni wpływ na adhezję i wirulencję bakterii.

Badania prowadzone na modelu zwierzęcym pokazały, że flagela jest zaangażowana w proces zakażenia u myszy i kurcząt. Bakterie pozbawione flageli w wyniku mutacji genów takich jak: *fliC*, *motAB* czy *cheA* wykazują obniżony poziom adhezji do komórek gospodarza w stosunku do bakterii szczepu dzikiego [115]. Obniżona adhezja może być spowodowana zarówno brakiem flageli (mutacje w genie *fliC*) jak i za-

burzeniem zdolności do chemotaksji (mutacje w genach *motAB*, *cheA*) [115]. Allen-Vercoe i wsp. (1999) pokazali, że bakterie nieposiadające flageli są znacznie mniej adherentne niż bakterie, u których zachowano flagelę ale upośledzono zdolność do poruszania się. Ponadto, niektóre obserwacje wykazały, że zarówno bakterie nieposiadające flageli jak i te, które jedynie nie były zdolne do ruchu nie różniły się pod względem inwazyjności. To sugeruje, że ruchliwość powoduje zwiększenie inwazyjności bakterii przez np. zwiększenie prawdopodobieństwa spotkania się bakterii z komórką gospodarza [118].

Wszystkie wyniki badań pokazują, że flagela jest potrzebna do inwazyjności, niemniej jednak nie ma pewności co do jej bezpośredniego udziału w tym procesie.

Mimo istniejących rozbieżności, większość prac pokazuje, że obecność flageli i zdolność do ukierunkowanego poruszania się bakterii jest bardzo ważna dla kolonizacji komórek gospodarza. Rozbieżności mogą wynikać z faktu, iż flagela nie jest jedyną strukturą zewnątrzkomórkową bakterii odpowiadającą za adhezję. Bakterie produkują różne struktury powierzchniowe np. adhezyne FimH, która należy do typu I pili rozpoznających terminalne mannozy glikoprotein na komórkach nabłonkowych [119]. Sprawę komplikuje fakt, że prawdopodobnie bakterie są w stanie produkować w jednym czasie albo struktury umożliwiające przyczepianie się bakterii do powierzchni albo flagelę. Najprawdopodobniej jest to po-

## Cholesterol jako miejsce adhezji bakterii

*Salmonella enterica* serotyp Typhi i *S. Typhimurium* są zdolne do tworzenia biofilmu na powierzchni cholesterolu, a wydajność zakażenia komórek nabłonkowych jest ściśle związana z jego ilością w błonie komórkowej [125]. Badania przeprowadzone na *S. Typhimurium* wykazały, że wprowadzenie mutacji w obrębie genów odpowiedzialnych za budowanie lub regulację systemu flagelinowego spowodowało obniżenie adhezji bakterii do cholesterolu. Co ważne, bakterie *S. Typhimurium* pozbawione genu *fliC* nie były zdolne do tworzenia biofilmu na cholesterolu, zaś bakterie posiadające flagelę, jednak niezdolne do poruszania się (delecja *motA*) formowały biofilm na cholesterolu z podobną wydajnością jak bakterie szczepu dzikiego. Badania ujawniły również, że martwe bakterie szczepu dzikiego adherowały do immobilizowanego cholesterolu z porównywalną wydajnością co żywe bakterie, skutecznie tworząc rusztowanie do później dodawanych bakterii – zarówno szczepu dzikiego, jak i pozbawionych flageli. Adhezja bakterii pozbawionych genu *fliC*, ale posiadających *fljB* była mocno zredukowana w porównaniu do bakterii posiadających flagelinę FliC, ale pozbawionych flageliny fazy drugiej FjlB. Zatem flagela zbudowana z białka flageliny FliC bierze udział w adhezji bakterii do cholesterolu oraz w początkowych fazach tworzenia biofilmu [126].

dyktowane zmiennymi warunkami środowiskowymi (temperatura, pH, osmolarność), które wymuszają na bakterii zmianę profilu ekspresji genów, w tym master-operonu *flhDC*.

Erhardt i wsp. (2015) zauważyli, że funkcjonalna flagela jest nie tylko niezbędna do zakażenia komórek nabłonkowych, ale również ma duże znaczenie przy fagocytozie bakterii przez makrofagi [133]. Należy wspomnieć, że proces ten nie kończy się unicestwieniem bakterii – *Salmonella* zmienia fagosom w wakuolę, w której przeżywa i namnaża się. Bakterie *S. Typhimurium* pozbawione genów *cheB* i *fliC* są znacznie słabiej fagocytywowane przez komórki żerne w stosunku do bakterii szczepu dzikiego, co również zaobserwowano w doświadczeniach przeprowadzonych na

szczepie *S. Dublin*, które zostały pozbawione genów *cheA*, *cheB* lub *fliC* [120].

U niektórych bakterii istnieje korelacja między ekspresją genów systemu flagelinowego a ekspresją genów bezpośrednio zaangażowanych w infekcyjność. W przypadku bakterii *Salmonella Paratyphi A* (ale nie bakterii *S. Typhimurium*) brak flageli wywołany delecją *fliC* skutkuje wzrostem transkrypcji innych genów samego systemu flagelinowego, jak i genów należących do pierwszej wyspy patogenności SPI-1 oraz wzmożoną sekrecją przez system sekrecji typu trzeciego T3SS. Jest to niezmiernie ciekawe zjawisko, ponieważ pokazuje zależność między aktywnością T3SS, biorącego bezpośredni udział w infekowaniu komórek, a upośledzeniem chemotak-

sji. Niektóre prace pokazują, że usunięcie flageli promuje propagację bakterii wewnątrz zakażonych makrofagów i obniżoną cytotoksyczność względem tych komórek. Bakterie *S. Typhimurium* pozbawione głównego elementu regulatorowego FlhD wykazują wyższy poziom zakażenia tkanek myszy w porównaniu do bakterii szczepu dzikiego oraz szybciej namnażają się wewnątrz makrofagów. Jednak w przypadku doświadczeń *in vitro* przeprowadzonych na ludzkich i mysich komórkach nabłonkowych zaobserwowano obniżoną wirulencję, a także obniżoną odpowiedź leukocytów na obecność tak zmutowanych bakterii. Obniżona odpowiedź na bakterie pozbawione flageli może być wynikiem braku stymulacji receptorów TLR5 przez flagelinę.

Nie tylko struktura flageli zdaje się być jednym z czynników wirulencji należącym do systemu flagelinowego. Innym czynnikiem wpływającym na wirulencję bakterii jest produkt ekspresji genu *flgM*, będący negatywnym regulatorem syntezy flageli. Niestety istnieje niewiele badań dotyczących analizy funkcji FlgM w kontekście wirulencji, jednak wiadomo, że wydajny proces zakażenia komórek myszy jest ściśle uzależniony od obecności FlgM. Istnieje tu pozorna sprzeczność – zarówno flagela, jak i negatywny regulator jej syntezy wzmagają wirulencję. Prawdopodobnie FlgM działa przez modulację aktywności FliA, który z kolei jest odpowiedzialny za regulację ekspresji genów *fliC* i *fliB* oraz genów SPI-1 [132].

Kinazy histydynowe z rodziny Che

także przyczyniają się do zachowania równowagi w procesie wirulencji bakterii. Bakterie *S. Typhimurium* pozbawione białek CheA, CheW, CheR oraz CheY wykazują wzmożoną inwazyjność *in vitro* [121]. Prawdopodobnie skrócenie czasu obracania się bakterii wokół własnej osi na rzecz wydłużenia ruchu prostoliniowego spowodował zmiany, w których bakteria rzadziej spotyka komórki w doświadczeniach *in vitro*. Z kolei brak budujących statory białek Mot oraz białka CheB skutkuje obniżoną wirulencją względem komórek nabłonkowych [118].

Kim i wsp. (2009) pokazują, że połączenia między ścieżkami wirulencji i chemotaksji u bakterii *S. Typhimurium* są bardzo skomplikowane, bowiem na wirulencję wpływa również (pośrednio przez system flagelinowy) białko TdcA [122]. TdcA jest aktywatorem operonu *tdc*, który koduje enzymy zaangażowane w ścieżki degradacji L-seryny i L-treoniny [122]. Mutacje w białku TdcA mają negatywny wpływ na inwazyjność oraz syntezę flageli w *S. Typhimurium*, ponieważ powodują zahamowanie produkcji odpowiedniej formy funkcjonalnego białka flageli FliC, a przez to obniżenie ruchliwości. Ponadto, ekspresja genów z SPI-1 jest hamowana w bakteriach ze zmutowanym TdcA, co jest związane z obniżeniem ekspresji FliZ, który z kolei jest pozytywnym regulatorem HilA – aktywatora genów SPI-1 [122, 123, 124].

Podsumowując, większość prac pokazuje, że flagela jest zaangażowana w adhezję i wirulencję bakterii albo

pośrednio przez zdolność do przemieszczania się w pobliże komórek gospodarza albo bezpośrednio np. przez oddziaływanie z elementami komórki eukariotycznej. Ponieważ wykazano, że mutacje w obębie białek odpowiedzialnych za poprawne funkcjonowanie systemu flagelinowego mogą powodować obniżenie wirulencji, ale również ku zaskoczeniu odkrywców hiperwirulencję bakterii, można śmiało stwierdzić, że system regulacyjny chemotaksji bakterii i niektóre mechanizmy wirulencji są ze sobą ściśle powiązane. Niestety mała ilość przeprowadzonych do tej pory badań nie pozwoliła na poznanie mechanizmów tych zależności. Ten rozdział pokazuje, że zależność wirulencji od obecności flageli i zdolności chemotaksji może być różna w różnych rodzajach/serotypach bakterii [13,123].

## Podsumowanie

System flagelinowy jest strukturą bardzo skomplikowaną pod względem budowy, a jego złożenie wymaga precyzyjnej regulacji na wielu etapach. Ze względu na to flagela stanowi szeroki obszar badań, w którym istnieje jeszcze wiele niewiadomych czekających na odkrycie. Do dzisiaj nie poznano dokładnych mechanizmów działania rotora. Podobnie jak szczegóły dotyczące oddziaływania białek opiekuńczych z FlgM, a także sposób w jaki uwalnia FliA przed opuszczeniem komórki nadal stanowią tajemnicę. Dotychczasowe publikacje pokazują, że system flagelinowy może

być wykorzystany w biotechnologii w celu sekrecji dużej ilości białek do medium. Może to mieć wiele zastosowań poczynając od produkcji białek rekombinowanych do medium hodowlanego (co ułatwia ich oczyszczanie), aż po produkcję białek terapeutycznych uwalnianych w miejscu nowotworu.

## Bibliografia

- [1] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi E, Goodlett DG, Eng JK, Akira S, Underhill DM & Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103
- [2] Choi, Y., Shin, H., Lee, J.-H., & Ryu, S. (2013). Identification and Characterization of a Novel Flagellum-Dependent Salmonella-Infecting Bacteriophage, iEPS5. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4829-4837.
- [3] Berg, H. C., and Anderson, R. A. (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* 245, 380-382
- [4] Kojima S, Blair DF. 2004. The bacterial flagellar motor: structure and function of a complex molecular machine. *Int Rev Cytol* 233: 93-134
- [5] Larsen, S. H., Reader, R. W., Kort, E. N., Tso, W.-W., and Adler, J. (1974). Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *E. coli*. *Nature* 249, 74-77.
- [6] Silverman, M., and Simon, M. (1974). Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* 249, 73-74.
- [7] Galan JE, Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328
- [8] Cornelis GR. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825
- [9] Cordes FS, Komoriya K, Larquet E, Yang S, Egelman EH, Blocker A, Lea SM. 2003. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 278: 17103-17107.
- [10] Saier MH Jr, 2004. Evolution of bacteria type III protein secretion system *Trends Microbiol* 12(3):113-5
- [11] Proft T, Backer EN (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure,

assembly, and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 66(4):613-35

[12] Karlinsey JE, Tanaka S, Bettenworth V, Yamaguchi S, Boos W, Aizawa SI, Hughes KT. 2000. Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Mol. Microbiol.* 37:1220-1231.

[13] Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology*, 2(4), 1242-1267

[14] Chevance FFV, Hughes KT. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Micro* 6: 455-465.

[15] Kutsukake K, Okada T, Yokoseki T, Iino T. (1994) Sequence analysis of the flgA gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, flgN. *Gene* 143(1):49-54.

[16] Wang S, Fleming RT, Westbrook EM, Matsumura P, McKay DB (2006) Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol.* 355(4):798-808.

[17] Zhou J, Sharp LL, Tang HL, Lloyd SA, Billings S, et al. 1998. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J. Bacteriol.* 180:2729-35

[18] Thormann KM, Paulick A. 2010. Tuning the flagellar motor. *Microbiology* 156:1275-1283.

[19] Thomas, D. R., Morgan, D. G., and DeRosier, D. J. (1999). Rotational symmetry of the C ring

[20] and mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10134-10139

[21] Sarkar, M. K., Paul, K., & Blair, D. (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9370-9375

[22] Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T. S., and Khan, S. (1996). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* 261, 195-208.

[23] Sockett H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V. M., and Macnab, R. M (1992). Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 174, 793-806

[24] Lloyd, S. A., Tang, H., Wang, X., Billings, S., and Blair, D. F. (1996). Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: Evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J. Bacteriol.* 178, 223-231.

[25] Yamaguchi S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S.-I., and Macnab, R. M. (1986b). Subdivision of flagellar genes of *Salmonella Typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J. Bacteriol* 166. 187-193

[26] Yamaguchi S Aizawa, S.-I., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C. J., and Macnab R.M. (1986a). Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagella rotor of *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 168. 1172-1179

[27] Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D., and DeRosier, D. J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* 235, 1261-1270

[28] Thomas, D., Morgan, D. G., and DeRosier, D. J. (2001). Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J. Bacteriol.* 183, 6404-6412.

[29] Aizawa, S.-I. (2000). Flagella. In "Encyclopedia of Microbiology," 2nd Ed., pp. 380-389. Academic Press, San Diego, CA.

[30] Khan, I. H., Reese, T. S., and Khan, S. (1992). The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5956-5960.

[31] Oosawa, K., Ueno, T., and Aizawa, S.-I. (1994). Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J. Bacteriol.* 176, 3683-3691.

[32] Zhou, J., Lloyd, S. A., & Blair, D. F. (1998). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6436-6441.

[33] Reid SW, Leake MC, Chandler JH, Lo CJ, Armitage JP, Berry RM 2006. The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8066-8071. 10.1073/pnas.0509932103

[34] Kim, E. A., Price-Carter, M., Carlquist, W. C., & Blair, D. F. (2008). Membrane Segment



Organization in the Stator Complex of the Flagellar Motor: Implications for Proton Flow and Proton-Induced Conformational Change. *Biochemistry*, 47(43), 11332-11339. <http://doi.org/10.1021/bi801347a>

[35] Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., Homma, M. and Namba, K. (2009), Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Molecular Microbiology*, 73: 710-718. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06802.x

[36] Muramoto, K. and Macnab, R. M. (1998), Deletion analysis of MotA and MotB, components of the force-generating unit in the flagellar motor of *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 29: 1191-1202. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00998.x

[37] T. Minamino, K. Namba Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export *Nature*, 451 (2008), pp. 485-488

[38] Vogler A. P., Homma, M., Irikura, V. M., & Macnab, R. M. (1991). *Salmonella Typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliL to F0F1, vacuolar, and archaeobacterial ATPase subunits *Journal of Bacteriology*, 173(11), 3564-3572

[39] Dreyfus G., Williams, A. W., Kawagishi, I., & Macnab, R. M. (1993) Genetic and biochemical analysis of *Salmonella Typhimurium* FliL a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F0F1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens *Journal of Bacteriology*, 175(10), 3131-3138

[40] Fan F. & Macnab, R.M. (1996) Enzymatic characterization of FliI: an ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 271: 31981-31988

[41] Minamino T, (2014) Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway 1843(8):1642-8

[42] Bai F., Morimoto YV., Yoshimura SDJ., Hara N., Kami-jke N., Namba K., Minamino T., (2014) Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus, *Nature*

[43] G.M. Fraser, J.C.Q. Bennett, C. Hughes Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly *Mol. Microbiol.*, 32 (1999), pp. 569-580

[44] F. Auvray, J. Thomas, G.M. Fraser, C. Hughes Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone *J. Mol. Biol.*, 308 (2001), pp. 221-229

[45] P. Aldridge, J.E. Karlinsey, K.T. Hughes (2003) The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL *Mol. Microbiol.*, 49 (pp. 1333-1345

[46] J. Thomas, G.P. Stafford, C. Hughes Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101 (2004), pp. 3945-3950

[47] Kinoshita, M., Hara, N., Imada, K., Namba, K. and Minamino, T. (2013), Interactions of bacterial flagellar chaperone-substrate complexes with FlhA contribute to co-ordinating assembly of the flagellar filament. *Molecular Microbiology*, 90: 1249-1261. doi:10.1111/mmi.12430

[48] Bennett J.C., Hughes C. (2000) From flagellum assembly to virulence: The extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* 8:202-204.

[49] Hirano T, Yamaguchi S, Oosawa K. et al. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1994;176:5439-5449

[50] Simon, Y., Curtis, B., Deumic, V., Nicki, J., Tennant SM., Pasetti, MF., Lees, A., Wills PW., Chacon M., Levine MM. (2014). A scalable method for biochemical purification of *Salmonella* flagellin. *Protein Expr Purif* 201: 1-7

[51] Ikeda, T., Oosawa, K., Yamaguchi, S. & Hotani, H. (1996). Self-assembly of the Filament Capping protein FliD of Bacterial Flagella into an Annular Structure. *J. Mol. Biol.* 259, 679-686.

[52] Samatey, Fadel A; Imada, Katsumi; Nagashima, Shigehiro; Vonderviszt, Ferenc; et al. *Nature*; London 410.6826 (Mar 15, 2001): 331-7

[53] Calladine, C. R., Luisi, B. F., & Pratap, J. V. (2013). A "Mechanistic" Explanation of the Multiple Helical Forms Adopted by Bacterial Flagellar Filaments. *Journal of Molecular Biology*, 425(5), 914-928.

[54] Kanto, S., Okino, H., Aizawa, S.-I., and Yamaguchi, S. (1991). Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin. *J. Mol. Biol.* 219, 471-480.

[55] McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M,

- Gheesling L, Brenner F, Fields PI. 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *fliA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.* 42:1923-1932
- [56] Bonifield, H. R., & Hughes, K. T. (2003). Flagellar Phase Variation in *Salmonella enterica* Is Mediated by a Posttranscriptional Control Mechanism. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3567-3574
- [57] Ikeda, J. S., Schmitt, C. K., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., ... O'Brien, A. D. (2001). Flagellar Phase Variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Contributes to Virulence in the Murine Typhoid Infection Model but Does Not Influence *Salmonella*-Induced Enteropathogenesis. *Infection and Immunity*, 69(5), 3021-3030
- [58] Mimori, Y., Yamashita, I., Murata, K., Fujiyoshi, Y., Yonekura, K., Toyoshima, C., and Namba, K. (1995). The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* 249, 69-87.
- [59] Trachtenberg S., and DeRosier, D. J. (1987). Three-dimensional structure of the frozen-hydrated flagellar filament: The left-handed filament of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol Biol* 195, 581-601
- [60] Toke, O., & Vonderviszt, F. (2016). Amphipathic helical ordering of the flagellar secretion signal of *Salmonella* flagellin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*
- [61] Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*. 424(6949):643-50.
- [62] Hirano T, Minamino T, Namba K, and Macnab RM. (2003) Substrate Specificity Classes and the Recognition Signal for *Salmonella* Type III Flagellar Export. *J. Bacteriol.* 185:8 2485-2492;
- [63] Singer, H. M., Erhardt, M. and Hughes, K. T. (2014), Comparative analysis of the secretion capability of early and late flagellar type III secretion substrates. *Molecular Microbiology*, 93: 505-520. doi:10.1111/mmi.12675
- [64] Vegh BM, Dobo GJ, Zavodszky P, Vonderviszt F. (2006). Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin. *Biochem Biophys Res Commun.* 345(1):93-8
- [65] Weber-Sparenberg C, Poplau P, Brookman H (2006) Characterization of the type III export signal of the flagellar hook scaffolding protein FlgD of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* 186(4):307
- [66] Guo, S., Alshamy, I., Hughes, K. T., & Chevance, F. F. V. (2014). Analysis of Factors That Affect FlgM-Dependent Type III Secretion for Protein Purification with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 196(13), 2333-2347
- [67] Cheng, L.W and Schneewind, O.. 2000 Type III machines of Gram-negative bacteria (delivering the goods) . *Trends Microbiol* 8: 214-220
- [68] Blair DF. (2003) Flagellar movement driven by proton translocation, *FEBS Letters* 545: 86-95, edited by Trumpower
- [69] Segall, J. E., Manson, M. D., and Berg, H. C. (1982). Signal processing times in bacterial chemotaxis. *Nature* 296, 855-857.
- [70] Bray, D., Levin, MD., Lipkow, K., (2007) The chemotactic behaviour of computer-based surrogate bacteria. *Curr.Biol.* 17, 12-19
- [71] Walker SL, Sojka M, Dibb-Fuller M, Woodward M (1999) Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteridis. *J. Med. Microbiol.* 48,253-261
- [72] Yokota, T., & Gots, J. S. (1970). Requirement of Adenosine 3', 5'-Cyclic Phosphate for Flagella Formation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 103(2), 513-516.
- [73] Chilcott, G. S., & Hughes, K. T. (2000). Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 694-708.
- [74] Partridge, J. D., & Harshey, R. M. (2013). More than Motility: *Salmonella* Flagella Contribute to Overriding Friction and Facilitating Colony Hydration during Swarming. *Journal of Bacteriology*, 195(5), 919-929
- [75] Li C, Shi W, Louise CJ, Adler J (1993). Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(8):2236-40
- [76] Soutourina OA, Karin E, Laurent-Winter C, Hommais F, Danchin A, Bertin PN (2002) Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS

protein. *Microbiology* 148, 1543-1551

[77] Adler J Templeton B (1967) The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 46, 175-184.

[78] Landini P Zehnder A J (2002) The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J. Bacteriol.* 184, 1522-1529

[79] Salah Ud-Din, AIM 2017, " Cellular and Molecular Life Sciences.

[80] Bi S, Lai L (2015) Bacterial chemoreceptors and chemoeffec-tors. *Cell Mol Life Sci* 372:691-708

[81] Lazova, M. D., Butler, M. T., Shimizu, T. S., & Harshey, R. M. (2012). *Salmonella* chemoreceptors McpB and McpC mediate a repellent response to L-cystine: a potential mechanism to avoid oxidative conditions. *Molecular Microbiology*, 84(4), 697-711

[82] Frye, J., Karlinsey, J.E., Felise, H.R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M., Hughes, K.T. (2006) Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 188, 2233-2243

[83] Sourjik, V., & Wingreen, N. S. (2012). Responding to Chemical Gradients: Bacterial Chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2), 262-268.

[84] Parkinson JS, Hazelbauer GL, Falke JJ (2015) Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends Microbiol* 23:257-266

[85] Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172:741-747.

[86] Wada T, Tanabe Y, Kutsukake K (2011) *FliZ* acts as a repressor of the *ydiV* gene, which encodes an anti-*FlhD4C2* factor of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* 193(19):5191-8.

[87] Gillen KL, Hughes KT (1991) Molecular characterization of *flgM*, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 191 173(20):6453-9.

[88] Iyoda S, Kutsukake K (1995) Molecular dissection of the flagellum-specific anti-sigma factor, *FlgM*, of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet.* 249(4):417-24.

[89] Liu X, Matsumura P. 1994. The *FlhD/FlhC* complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* 176:7345-7351

[90] Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H, Lino T. 1992. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol. Microbiol.* 6:3149-3157.

[91] Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science.* 262(5137):1277-80.

[92] Karlinsey JE, Tsui HC, Winkler ME, Hughes KT (1998) *Flk* couples *flgM* translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 180(20):5384-97.

[93] Chadsey, M. S., Karlinsey, J. E., & Hughes, K. T. (1998). The flagellar anti- $\sigma$  factor *FlgM* actively dissociates *Salmonella typhimurium*  $\sigma^{28}$  RNA polymerase holoenzyme. *Genes & Development*, 12(19), 3123-3136

[94] Daughdrill GW, Chadsey MS, Karlinsey JE, Hughes KT, Dahlquist FW. 1997. The C-terminal half of the anti-sigma factor, *FlgM*, becomes structured when bound to its target, sigma 28. *Nat. Struct. Biol.* 4:285-291

[95] Yokoseki T, Iino T, Kutsukake K. 1996. Negative regulation by *fliD*, *fliS*, and *fliT* of the export of the flagellum-specific anti-sigma factor, *FlgM*, in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 178:899-901

[96] Aldridge PD, Karlinsey JE, Aldridge C, Birchall C, Thompson D, Yagasaki J, Hughes KT. 2006. The flagellar-specific transcription factor, sigma28, is the type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti-sigma28 factor *FlgM*. *Genes Dev.* 20:2315-2326

[97] Xu S, Peng Z, Cui B, Wang T, Song Y, Zhang L, Wei G, Wang Y, Shen X. 2013. *FliS* modulates *FlgM* activity by acting as a non-canonical chaperone to control late flagellar gene expression, motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Environ. Microbio*

[98] Saini S, Koirala S, Floess E, Mears PJ, Chemla YR, Golding I, Aldridge C, Aldridge PD, Rao CV (2010) *FliZ* induces a kinetic switch in flagellar gene expression. *J Bacteriol.* 192(24):6477-81

[99] Saini S, Brown JD, Aldridge PD, Rao CV. (

- 2008) FliZ Is a posttranslational activator of FlhD4C2-dependent flagellar gene expression. *J Bacteriol* Jul; 190(14):4979-88.
- [100] Wada T, Morizane T, Abo T, Tominaga A, Inoue-Tanaka K, Kutsukake K (2011) EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol*.193(7):1600-11.
- [101] Liu, X. and Matsumura, P. (1996), Differential regulation of multiple overlapping promoters in flagellar class II operons in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 21: 613-620
- [102] Yamamoto S, Kutsukake K (2006) FliT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol*. 188(18):6703-8.
- [103] Aldridge C, Poonchareon K, Saini S, Ewen T, Soloyva A, Rao CV, Imada K, Minamino T, Aldridge PD (2010) The interaction dynamics of a negative feedback loop regulates flagellar number in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2010 Dec; 78(6):1416-30.
- [104] McCarthy EF (2006) The toxins of William B Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 26: 154-148.
- [105] Green PN, Hoption Cann SA (2007) Bacterial anti-cancer vaccines: a science frozen in time. *Microbiologist* 8: 29-34.
- [106] Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15155-15160
- [107] Toley BJ, Forbes NS (2012) Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. *Integr Biol (Camb)* 4: 165-176.
- [108] Guidance for Industry: Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products, US Food and Drug Administration, 2012; Environmental Risk Assessments for Medicinal Products containing, or consisting of, Genetically Modified Organisms, European Medicines Agency, 2007
- [109] Brodway KM., Denson EAP., Jensen RV., Scharf BE., 2015 Rescuing chemotaxis of the anticancer agent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium VNP20009 *Journal of Biotechnology* 211, 117-120
- [110] Terashima, H., Kojima, S., Homma, M., 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 270, 39-85.
- [111] Morimoto, Y.V., Minamino, T., 2014. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* 4, 217-234.
- [112] Volz, K., Matsumura, P., 1991. Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 266, 15511-15519
- [113] Brodway KM, Modise T, Jensen RV, Scharf BE (2014) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium VNP20009, a strain engineered for tumor targeting. *J. Biotechnol* 192, 177-8
- [114] Dobó, J., Varga, J., Sajó, R., Végh, B. M., Gál, P., Závodszky, P., & Vonderviszt, F. (2010). Application of a Short, Disordered N-Terminal Flagellin Segment, a Fully Functional Flagellar Type III Export Signal, to Expression of Secreted Proteins . *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 891-899.
- [115] Allen-Vercoe E. Woodward, M.J. (1999) The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J. Med. Microbiol* 48, 771-780
- [116] Allen-Vercoe E. Sayers, A.R., Woodward, M.J. (1999) Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. *Epidemiol. Infect.* 122, 395-402
- [117] Elhadad D, Desai P, Rahav G, McClelland M, Gal-Mor O. 2015. Flagellin is required for host cell invasion and normal *Salmonella* pathogenicity island 1 expression by *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A. *Infect Immun* 83:3355-3368.
- [118] Khoramian-Falsafi T, Harayama S, Kutsukake K, Pechère JC. (1990) Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella typhimurium* into HeLa cells. *Microb Pathog*;9(1):47-53.
- [119] Sauer, M. M., Jakob, R. P., Eras, J., Baday, S., Eriş, D., Navarra, G., ... Glockshuber, R. (2016). Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nature Communications*, 7, 10738. <http://doi.org/10.1038/ncomms10738>
- [120] Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesús J, Rosenkranz J, Chadfield MS, Thomsen LE *BMC Microbiol*. 2013 Mar 25; 13():67.

- [121] Jones, B. D., Lee, C. A., & Falkow, S. (1992). Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infection and Immunity*, 60(6), 2475–2480.
- [122] Kim M, Lim S, Kim S, Choy HE, Sangryeol A (2009) *tdcA* Mutation Reduces the Invasive Ability of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Ryu. *Mol. Cells* 28(4): 389–395
- [123] Lucas, R. L., Lostroh, C. P., DiRusso, C. C., Spector, M. P., Wanner, B. L., & Lee, C. A. (2000). Multiple Factors Independently Regulate *hilA* and Invasion Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1872–1882.
- [124] Ikebe T, Iyoda S, Kutsukake K. Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. 1999;145:1389–1396
- [125] Zhou M. Duan Q. Li Y. Yang Y. Hardwidge PR. Zhu G (2015) Membrane cholesterol plays an important role in enteropathogen adhesion and the activation of innate immunity via flagellin-TLR5 signaling. *Arch Microbiol* 197(6):797–803
- [126] Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS. *J Bacteriol*. 2010 Jun; 192(12):2981–90. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces.
- [127] Low KB, Ittensohn M, Luo X, Zheng LM, King I, Pawelek JM, Bermudes D (2004) Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting *Salmonella* for parental administration in humans. *Methods Mol Med* 90: 47–60.
- [128] Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ (2002) Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 20:142–152
- [129] Coutermarsh-Ott, S. L., Broadway, K. M., Scharf, B. E., & Allen, I. C. (2017). Effect of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium VNP20009 and VNP20009 with restored chemotaxis on 4T1 mouse mammary carcinoma progression. *Oncotarget*, 8(20), 33601–33613. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.16830>
- [130] Zheng JH, Nguyen VH, Jiang SN, Park SH, Wan W, Hong SH, Shin MG, Chung IJ, Hong Y, Bom HS, Choy HE, Lee SE, Rhee JH, Min JJ (2017) Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella Typhimurium* secreting heterologous flagellin. *Sci Transl Med*. 9(356)
- [131] Galeva, A., Moroz, N., Yoon, Y.-H., Hughes, K. T., Samatey, F. A., & Kostyukova, A. S. (2014). Bacterial Flagellin-Specific Chaperone *FliS* Interacts with Anti-Sigma Factor *FlgM*. *Journal of Bacteriology*, 196(6), 1215–1221. <http://doi.org/10.1128/JB.01278-13>
- [132] Guo, S., Alshamy, I., Hughes, K. T., & Chevance, F. F. V. (2014). Analysis of Factors That Affect *FlgM*-Dependent Type III Secretion for Protein Purification with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 196(13), 2333–2347. <http://doi.org/10.1128/JB.01572-14>
- [133] Erhardt, M., & Dersch, P. (2015). Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia* virulence. *Frontiers in Microbiology*, 6, 949. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00949>